

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกโคลนยูคาลิปตัสภายใต้สภาวะเครียดจากโซเดียม คลอไรด์

1.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์

ศึกษาการเจริญเติบโต (มวลแห้ง) และอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัสจำนวน 6 โคลน ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ สายพันธุ์การค้า (C1 และ C2), สายพันธุ์อ่อนแอ (C3 และ C4) และ สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากพื้นที่ดินเค็ม (C5 และ C6) จากบริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด มาเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ (0 (control), 100 และ 200 mM) โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัสทั้ง 6 โคลน โดยคัดเลือกโคลนที่มีการเจริญเติบโตดีและมีอัตราการอยู่รอดสูงสุดสองลำดับแรกให้เป็นตัวแทนโคลนทนเค็ม และโคลนที่มีการเจริญเติบโตต่ำและมีอัตราการอยู่รอดต่ำสุดเป็นตัวแทนโคลนอ่อนแอ จำนวน 1 โคลน เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX รวมถึงวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดในยูคาลิปตัส

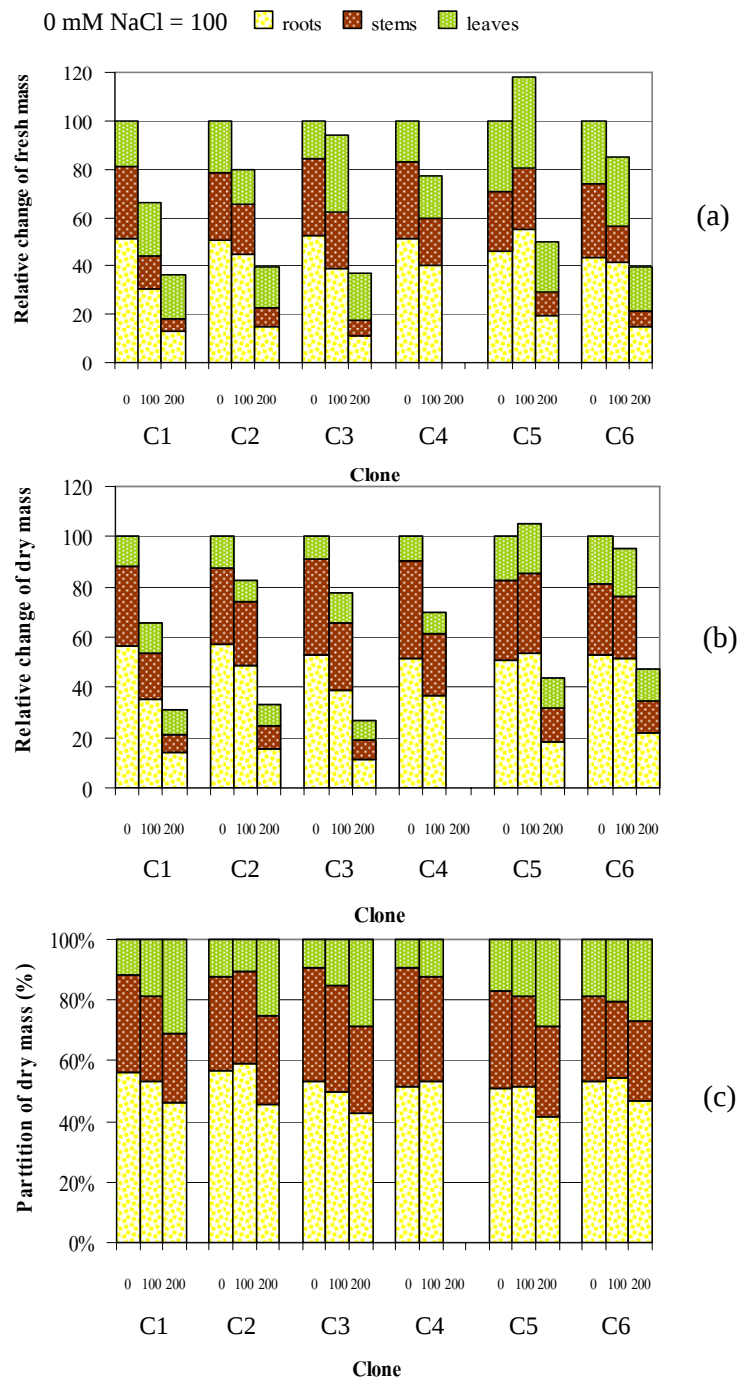
ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสทั้ง 6 โคลน ในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ (0 (control), 100 และ 200 mM) แสดงมวลสดและมวลแห้ง ไว้ดังตารางผนวกที่ 1 และแสดงอัตราการอยู่รอดไว้ดังตารางผนวกที่ 2

จากผลการทดลองในวันที่ 14 และ 28 หลังจากให้โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 mM พบว่า การเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัสทั้ง 6 โคลน ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ตารางผนวกที่ 1) แต่ในลำดับที่มีโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 200 mM ยูคาลิปตัสทั้ง 6 โคลน มีการเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) (ตารางผนวกที่ 1 และ 2) ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ายูคาลิปตัสทั้ง 6 โคลน สามารถทนและปรับตัวได้ดีในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 mM แต่ไม่ทนทานต่อสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 200 mM จึงมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง และเกิดการตายในบางโคลน

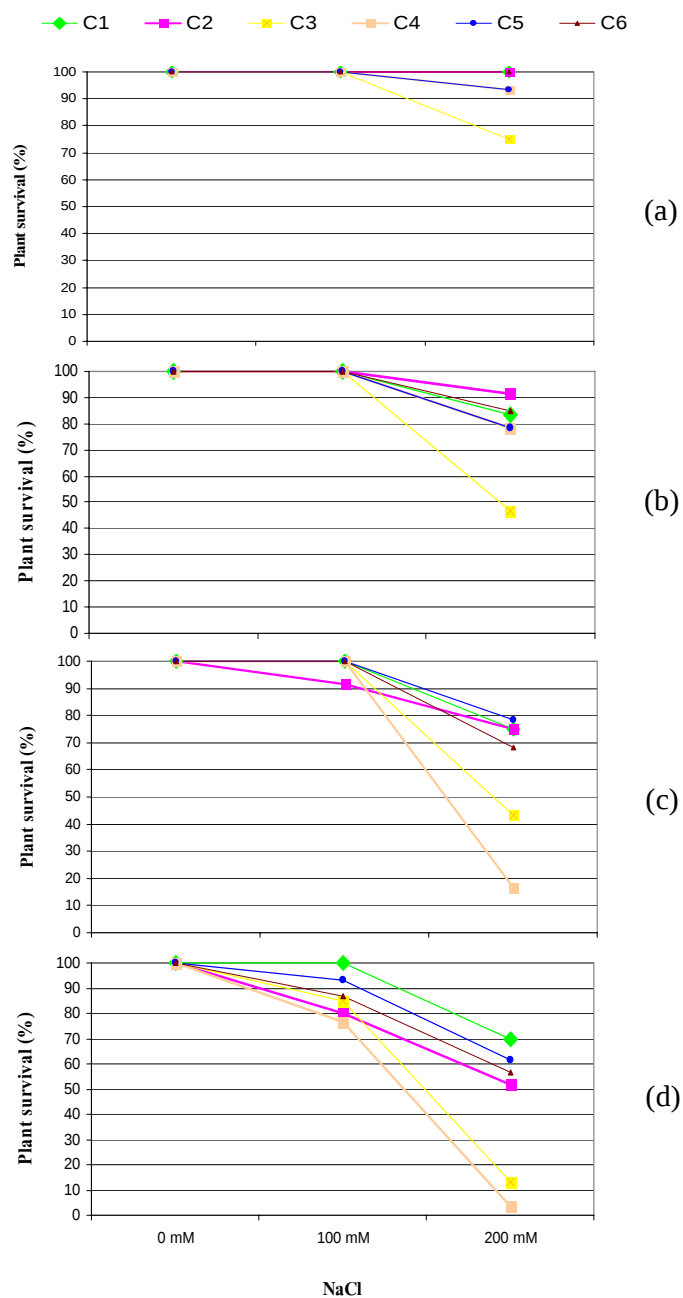
จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสทั้ง 6 โคลน ที่ 28 วันหลังจากได้รับโซเดียมคลอไรด์ 200 mM พบว่า มวลแห้งเฉลี่ยของยูคาลิปตัส โคลน C1, C2, C3 และ C4 ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่โคลน C1, C3 และ C4 มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากกว่าโคลน C5 และ C6 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) (ตารางผนวกที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัส พบว่า โคลน C1 (70%) มีอัตราการอยู่รอดสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) รองลงมาคือ โคลน C5 (61.67%), C6 (56.67%), C2 (51.67%), C3 (13%) และ C4 (3.33%) ตามลำดับ (ภาพที่ 5 และ ตารางผนวกที่ 2)

1.2 คัดเลือกยูคาลิปตัสจำนวน 3 โคลน

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกได้พิจารณาจากการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัส โดยให้โคลนที่มีการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดสูงที่สุดสองลำดับแรกเป็นตัวแทน โคลนทนเค็ม และโคลนที่มีการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดต่ำที่สุด 1 โคลนให้เป็นตัวแทน โคลนอ่อนแอ ผลจากการพิจารณาการเจริญเติบโตพบว่า มวลแห้งเฉลี่ยระหว่างยูคาลิปตัสสายพันธุ์การค้า (C1 และ C2) และ สายพันธุ์อ่อนแอ (C3 และ C4) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงได้พิจารณาจากอัตราการอยู่รอดเพียงอย่างเดียว ผลจากการคัดเลือกยูคาลิปตัสที่มีอัตราการอยู่รอดสูงสุดสองอันดับแรก ได้แก่ โคลน C1 และ C5 ให้เป็นตัวแทนโคลนทนเค็ม เนื่องจากโคลน C1 มีการเจริญเติบโตดีและมีอัตราการรอดตายสูงที่สุด (70%) และ โคลน C5 มีการเจริญเติบโตต่ำกว่า แต่เมื่อศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ ต่อมวลแห้งของพืช (ภาพที่ 3 และ 4) พบว่าโคลน C5 ใกล้เคียงกับสายพันธุ์การค้า (C1 และ C2) นอกจากนี้ยังมีอัตราการรอดตายสูงเป็นอันดับสอง (61.67%) ส่วนโคลน C4 ให้เป็นตัวแทนโคลนอ่อนแอ เนื่องจากมีอัตราการรอดตายต่ำสุด (3.33%) เมื่อศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ ต่อมวลแห้งของพืช (ภาพที่ 3 และ 4) พบว่าได้รับผลกระทบมากที่สุด วิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกยูคาลิปตัสครั้งนี้เป็นวิธีที่มาตรฐานซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองที่ 2 เช่นกัน



ภาพที่ 4 a) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลสด b) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลแห้ง c) การกระจายมวลแห้งของยูคาลิปตัส ในแต่ละโคลน (C1, C2, C3, C4, C5 และ C6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 28 วัน หลังจากย้ายปลูก



ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของยูคาลิปตัส ในแต่ละโคลน (C1, C2, C3, C4, C5 และ 6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 7 วัน (a), 14 วัน (b), 21 วัน (c) และ 28 วัน (d) หลังจากย้ายปลูก

การทดลองที่ 2 การศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนภายใต้สภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์

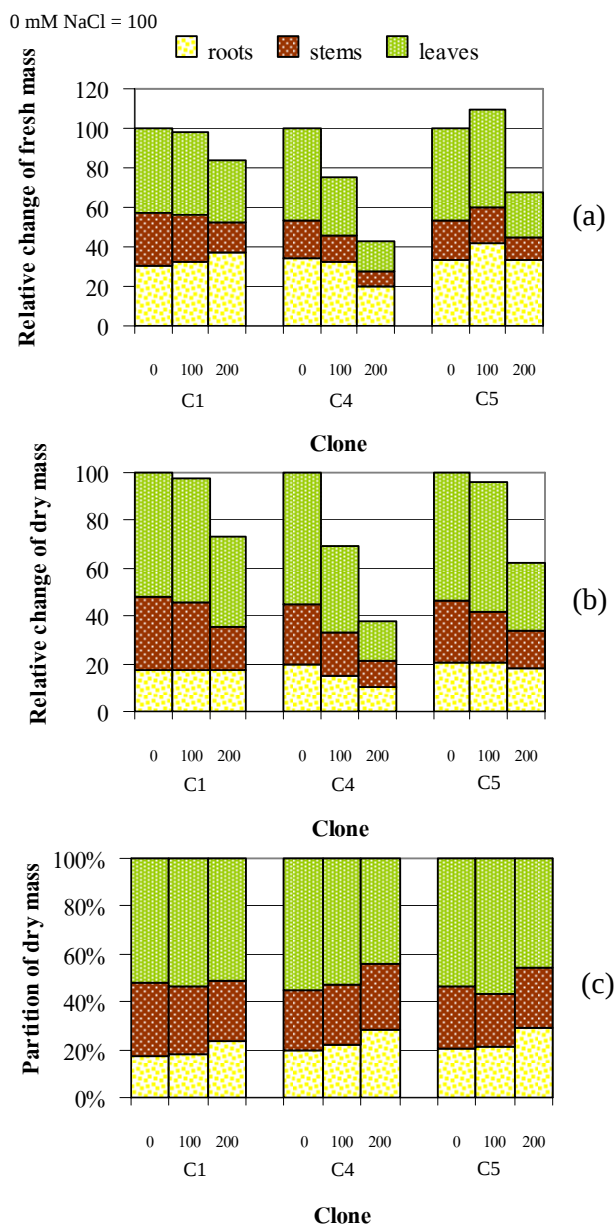
2.1 การเจริญเติบโตของยูคาลิปตัส

ศึกษาการเจริญเติบโต (มวลแห้ง) และอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัสโคลนทนเค็ม (โคลน C1 และ C5) และโคลนอ่อนแอ (โคลน C4) ที่ได้รับการคัดเลือกจากการทดลองที่ 1 โดยเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ (0 (control), 100 และ 200 mM) ผลจากการทดลองแสดงค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง แสดงไว้ดังตารางผนวกที่ 3 และอัตราการอยู่รอดแสดงไว้ดังตารางผนวกที่ 4

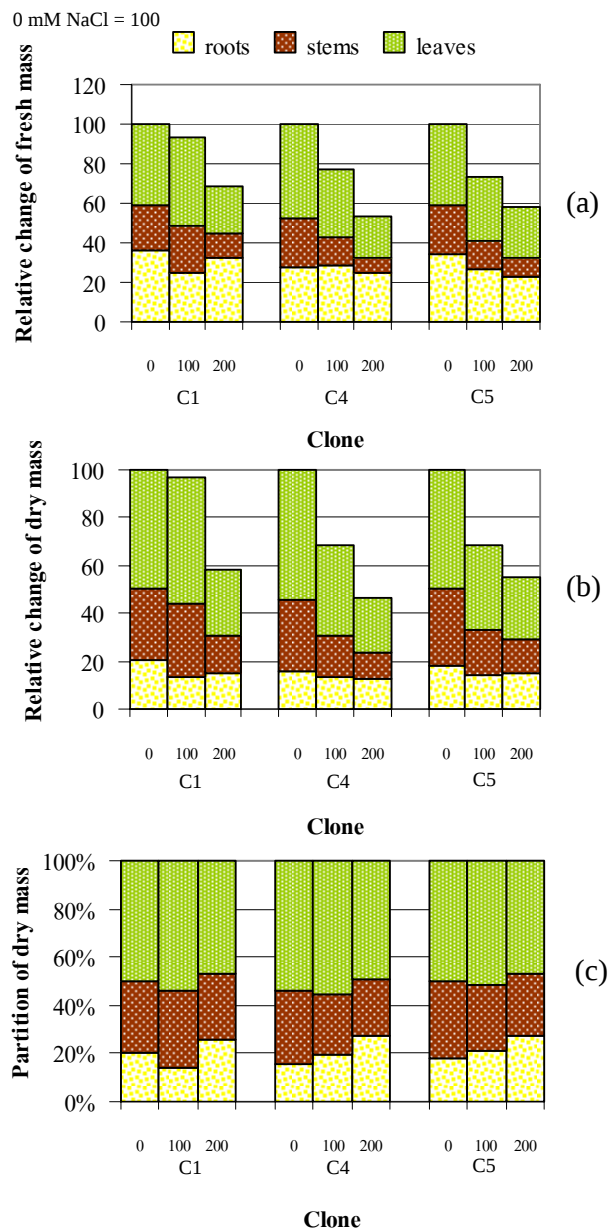
จากการปลูกยูคาลิปตัสทั้ง 3 โคลน ในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 100 mM เป็นเวลา 7 และ 14 วันหลังจากย้ายปลูก มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจาก control แต่ในวันที่ 21 พบว่า การเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) (ตารางผนวกที่ 3 และ 4) เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 200 mM ในวันที่ 7 ถึง 21 พบว่าการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) ลักษณะอาการของยูคาลิปตัสเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์แสดงไว้ดังภาพผนวกที่ 1

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสทั้ง 3 โคลน ที่ 21 วันหลังจากย้ายปลูก ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น พบว่า โคลน C5 มีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่าโคลน C1 และ C4 (ตารางผนวกที่ 5) เมื่อศึกษาอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัส ในวันที่ 7 และ 14 หลังจากย้ายปลูก ที่ระดับความเข้มข้น 200 mM พบว่า ยูคาลิปตัสโคลน C5 ไม่มีการตายในช่วงดังกล่าว แต่อัตราการอยู่รอดของโคลน C1 และ C4 ลดลง เมื่อพิจารณาที่ 21 วันหลังจากย้ายปลูก พบว่าโคลน C5 มีอัตราการอยู่รอดมากกว่าโคลน C1 และ C4 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ภาพที่ 9 และ ตารางผนวกที่ 4)

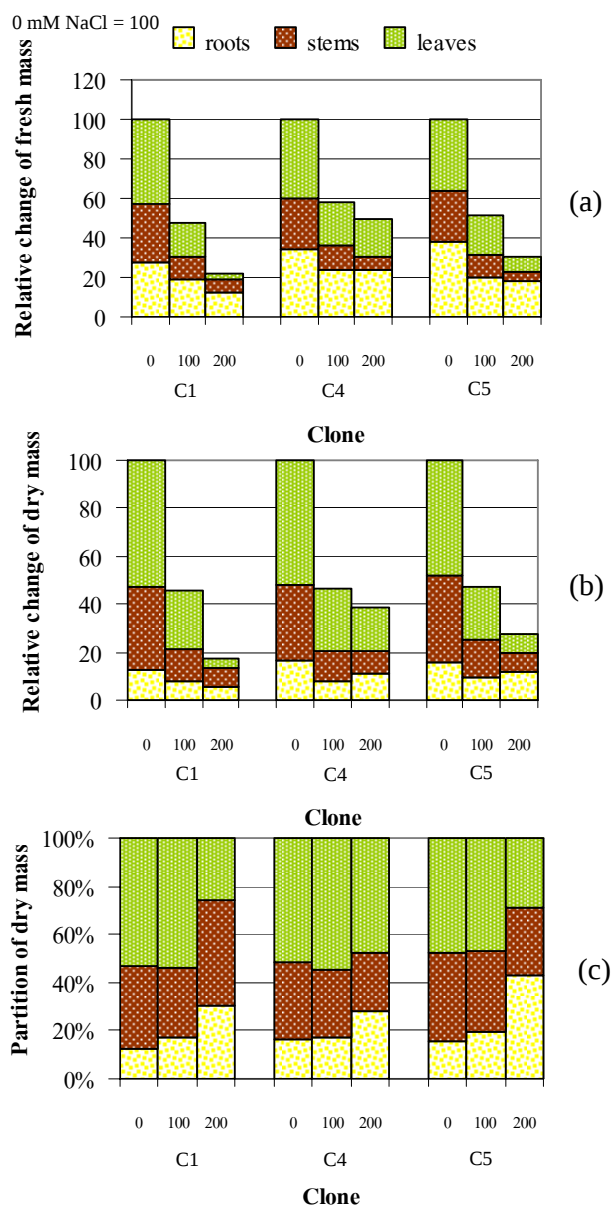
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โคลน C5 สามารถทนโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 mM ได้ดีกว่าโคลน C1 และ C4 เนื่องจากโคลน C5 มีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดในสารละลายที่มีโซเดียมคลอไรด์ได้ดีกว่าทั้ง 2 โคลน



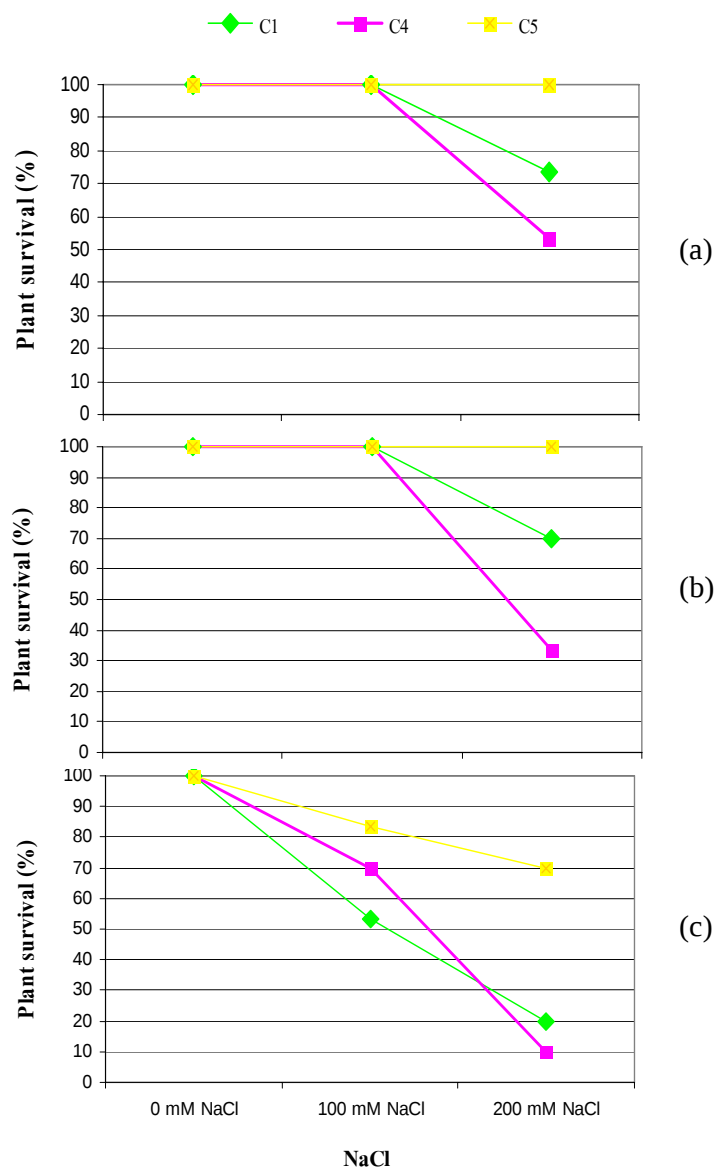
ภาพที่ 6 a) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลสด b) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลแห้ง c) การกระจายมวลแห้งของยูคาลิปตัสในแต่ละ โคลน (C1, C4 และ C6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 7 วัน หลังจากย้ายปลูก



ภาพที่ 7 a) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลสด b) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลแห้ง c) การกระจายมวลแห้งของยูคาลิปตัสในแต่ละโคลน (C1, C4 และ C6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 14 วัน หลังจากย้ายปลูก



ภาพที่ 8 a) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลสด b) ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อมวลแห้ง c) การกระจายมวลแห้งของยูคาลิปตัสในแต่ละโคลน (C1, C2 และ C3) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 21 วัน หลังจากย้ายปลูก



ภาพที่ 9 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของยูคาลิปตัสในแต่ละโคลน (C1, C4 และ C6) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 7 วัน (a) 14 วัน (b) และ 21 วัน (c) หลังจากย้ายปลูก

2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX ในยูคาลิปตัสภายใต้สภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์

2.2.1 การออกแบบ primer และ การสังเคราะห์ cDNA จาก RNA

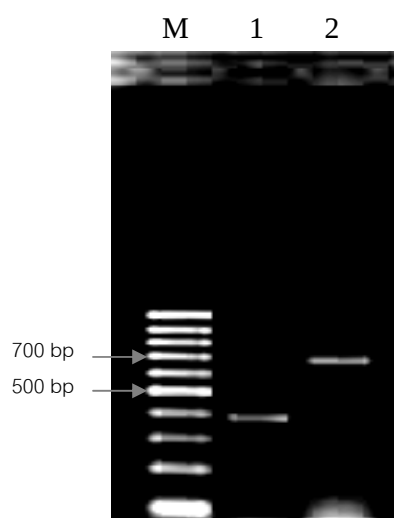
เนื่องจากยังไม่มีการศึกษา ยีน Cu/Zn SOD และ APX ในยูคาลิปตัสจึงได้ออกแบบ primer จากช่วงลำดับอนุรักษ์ของเบสและกรดอะมิโนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ในพืชชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการทำ alignment โดยใช้โปรแกรมจาก ClustalW (Website <http://www.ebi.ac.uk>) ทำให้หาช่วงลำดับอนุรักษ์ได้โดยออกแบบ primer แสดงผลดังตารางที่ 4 เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน โดยการทำ RT-PCR

ผลจากการการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ในยูคาลิปตัส โดยใช้ primer ที่ออกแบบ ได้ตรวจสอบโดยการทำ อิเล็กโตรโฟรีซิส 1% agarose gel (ภาพที่ 11) ซึ่งแสดงขนาดชิ้นส่วนของยีนทั้งสอง พบว่าขนาดใกล้เคียงกับที่เราต้องการสังเคราะห์ คือมีขนาดประมาณ 400 และ 700 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นก็นำชิ้นส่วนของยีนทั้งสองไปเพิ่มปริมาณโดยการทำ Cloning

ตารางที่ 4 แสดง primer ที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ในยูคาลิปตัส

primer	ลำดับเบสจากปลาย 5' ไป 3'	จำนวนเบส	ขนาด ที่คาดหวัง
Cu/Zn Superoxide dismutase			
S I	GAAGGAGATGGTCCAACCAC	20	393 คู่เบส
S II	CCCTGCAGKCCAATAATACC	20	
Ascorbase peroxidase			
A I	GRGGWYTSATYKCTGAGAAGMATTGYGC	28	693 คู่เบส
A II	TTAAGCWTCAGCAA WCCMARTTCAG	26	

หมายเหตุ Y=C/T, M=A/C, R=A/G, K=G/T และ W=A/T



ภาพที่ 10 แอบริ่งส่วนของยีน Cu/Zn SOD ขนาดประมาณ 400 คู่เบส (lane 1) และ ยีน APX ขนาดประมาณ 700 คู่เบส (lane 2) ที่ได้จากการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ของใบ ยูคาลิปตัส โดยใช้ primer S1, S2 และ A1, A2 ตามลำดับ M คือ DNA ขนาดมาตรฐาน ขนาดต่างกัน 100 คู่เบส

2.2.2 การโคลนชิ้นส่วนของยีนและวิเคราะห์สายลำดับเบสของ cDNA

เมื่อนำชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดไปวิเคราะห์หาลำดับเบส พบว่ามีขนาด 390 และ 684 คู่เบส ตามลำดับ แสดงลำดับเบสไว้ดังภาพที่ 11 และ 12 ตามลำดับ เมื่อนำลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีนทั้งสองมาเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับยีนในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST N, BLAST X และใช้โปรแกรม ClustalW ในการเทียบเรียงลำดับเบส ชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ของยูคาลิปตัสกับพืชชนิดอื่น พบว่าชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับพืชชนิดอื่น ๆ เช่น *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (85%), *Arachis hypogaea* (83%), *Fagus sylvatica* (83%) และ *Manihot esculenta* (83%) (ภาพที่ 13) และชิ้นส่วนของยีน APX มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับพืชชนิดอื่น ๆ เช่น *Fragaria x ananassa* (80%), *Camellia sinensis* (79%), *Capsicum annuum* (78%) และ *Nicotiana tabacum* (78%) (ภาพที่ 14) ดังนั้น primer ที่สังเคราะห์ขึ้นมานำไปใช้ในการสังเคราะห์ probe เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการทำ northern blot analysis

1	GAAGGAGATG	GTCCAACCAC	AGTAACTGGA	AGTCTGTCTG	GCCTTAAGCC
51	TGGACTTCAT	GGTTTCCATG	TCCATGCTCT	CGGAGACACC	CGGAGACACC
101	ACAAATGGCT	GTATGTCAAC	AGGACCACAC	TTTAATCCTT	GTGGCAAAGA
151	GCATGGAGCC	CCTGAAGACC	AGAACCGTCA	TTGGGGAATG	TGAATGTGGG
201	TGATGATGGC	ACTGTTAGTT	TCACAATCAT	TGATAACCAG	ATTCCTCTCA
251	GTGGACCAAA	CTCAATTGTT	GGAAGGGCTG	TCGTTGTTCA	TGGAGATCCT
301	GATGATCTTG	GGAAGGGTGG	GCACGAACTT	AGCAAAACAA	CTGGGAATGC
351	TGGTGGCAGA	GTTGCTTGCG	GTATTATTGG	CCTGCAGGGA	

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD จากยูคาลิปตัส ขนาด 390 คู่เบส โดยใช้ primer S1 และ S2

1	TTAAGCTTCA	GCAAATCCAA	G TTCAGAGAG	CTTCAGATGG	GCTTCAGCAT
51	AGTCTTCAAA	GAAGGCATCT	TCATCCGCAG	CATATTTCTC	AACAAGAGGG
101	CGGAAAACAG	GGTCAGCAAG	AAGAGCCTTA	TCACTTGGCA	GCTGAAGAAG
151	TTCTTTCTTC	TCTCCGCTCA	ACAATTCCTT	GAAGTACGAG	TTGTCGAATA
201	TGAGGGGATT	TGCGGTCCAG	GTTCCCTCAA	ATCCAGACCT	CTCCTTGTGG
251	CACCTTCCCA	GGGTATGGCC	ACCAGAGAGG	GCCACAATAT	CCTTGTGAGA
301	AAGGCCCATC	TGAACACCAA	ACACTTGTCT	CAAGTGGTCA	CAGCCCCTGG
351	TAGCATCAGG	AAGACGGCCC	TCGGGAGGTG	GTTGTGGTTT	GTCTCTCTTT
401	CCGGGGTGAA	AAGCAACTTC	AGGTCCACCA	GTAACCTCCA	CAGCAACGAC
451	GCCAGCCAGC	TGGTAGAAAT	CAGCATAAGT	GATGATGGGG	AACTGATCCT
501	TGATCGGCTG	CAAGAGCCTG	ACGGCAACGT	CGAGCCCGCT	GTTGGCCCCG
551	TGGCTGAGCT	CCGCGGCGTG	CTTCATGGTC	CCGAACGGGC	CTCCGGTCTT
601	CGTCTTCACA	TCGAAGGTAC	CGGCGGAGTG	CCACGCGATA	CGGAGCATGA
651	GCGGAGCGCA	ATTCTTCTCA	GAAATGAAAC	CCCA	

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน APX จากยูคาลิปตัส ขนาด 684 คู่เบส โดยใช้ primer A1 และ A2

```

Manihot -----ATGGTGAAGGCCGTTGCT 18
Populus -----ATGGTGAAGGCTGTTGCT 18
Fagus TCAGTTCTACAGCTAGGGGTGTTCTGAGATCACATAGAACGATGGCCAAGGGTGTGGCT 60
Eucalyptus
Arachis -----ATGGTGAAGGCTGTGGCA 18

Manihot GTTCTTAACAGTAGTGAGGGTGTGCTGGGACAATCTTCTCACCCAAGAAGGAGATGGT 78
Populus GTTCTGAATAGCAGTGAAGGTGTCAAAGGCACCATCAACTTTACCCAAGAAGGAGATGGT 78
Fagus GTTCTTAGCTCGAATGAGGGTGTGTTGGCACTATCTACTTTGCCCAAGAAGGAGATGGC 120
Eucalyptus -----GAAGGAGATGGT 12
Arachis GTTCTTAGCAGCAGTGAGGGTGTAGTGGAATATTCAATTCTCTCAGGAAGGAAATGGT 78
*****

Manihot CCAACCACCGTCACTGGAAGTGTTCTGGCCTTAAGCCAGGCTTCATGGATTCCATGTT 138
Populus CCAACTACTGTAAGTGAAGCCTCTGTGGTCTTAAGCCAGGCTTCATGGCTTCATGTT 138
Fagus CCAACTACAGTAAGTGAAGTATTTCTGGCCTTAAGCCTGGACTCCATGGCTTCACGCTG 180
Eucalyptus CCAACCACAGTAAGTGAAGTCTGTCTGGCCTTAAGCCTGGACTTCATGGTTCCATGTC 72
Arachis CCAACCAGTGTGACTGGAATCTGTCTGGCCTTAAGCCTGGTCTTCATGGGTTCCATGTC 138
*****

Manihot CATGCCCTTGGAGACACAACAAATGGTTGCATGTCAACTGGGCCACATTTCAACCTCGGT 198
Populus CATGCCCTTGGAGACACCAAAATGGCTGCATGTCAACTGGCCCGCATTTTAACTCCTGTA 198
Fagus CATGCTCTTGGGACACAACAAATGGTTGCATGTCAACTGGACCACATTTCAATCCTGTG 240
Eucalyptus CATGCTCTCGGAGACACCAAAATGGCTGTATGTCAAAGGACCACTTTAACTCCTGTG 132
Arachis CATGCCCTTGGAGACACCAAAATGGTTGCCTGTCAACTGGACCGCATTTCAATCCTAAC 198
*****

Manihot GGCAAAAGAGCATGGTGGCCCTGAGGACGACATTCGTCATGCTGGTGATCTGGGAAATGTC 258
Populus GGCAAAAGAGCATGGTGGCCCTGAGGATGAGAATCGTCATGCTGGTGATTTGGGAAATGTC 258
Fagus GGCAAAAGAGCATGGTGGCCCTGAGGATGCGAATCGTCATGCTGGTGATCTGGGAAATGTC 300
Eucalyptus GGCAAAAGAGCATGGAGCCCTGAAGACCAAGAACCGTCATGCGGGTGATTTGGGAAATGTC 192
Arachis AACAAGGAGCATGGTGGCCCTGAAGATGAGAACCCTGCTGGTGATTTAGGAAATGTT 258
*****

Manihot ACTGCTGGTGATGATGGCACTGCTAGTTTCACAATCGTTGACAAGGATATTCCTCTTTCT 318
Populus ACTGTTGGTGATGATGGCACCGCTACTGTCTCAATCATTGACAACCAAGATTCCTCTCACT 318
Fagus AATGTTGGTGATGATGGCAGTCAGTTTCACAATAATTGACAAAACAGATTCCTCTTGT 360
Eucalyptus AATGTGGTGATGATGGCACTGTTAGTTTCACAATCATTGATAACCAAGATTCCTCTCAGT 252
Arachis AATGTTGGAGATGATGGAACCTGTTAGCTTCTCCATTCCGACAGTCAGATCCCTCTTAGT 318
*****

Manihot GGTCCGCATTCCATTGTAGGAAGGGCAGTCGTTGTTTCATGCAGATCCTGATGATCTTGG 378
Populus GGACCAAAATCCATCGTTGGAAGGGCTGTTGTTGTTTCATGCAGATCCTGATGATCTTGGC 378
Fagus GGTCCAAATTCATTATCGGAAGGGCTGTTGTTGTTTCATGCAGATCCTGATGATCTTGGC 420
Eucalyptus GGACCAAACTCAATTGTTGGAAGGGCTGTCGTTGTTTCATGCAGATCCTGATGATCTTGGG 312
Arachis GGACCAAACTCCATTGTTGGAAGGGCTGTTGTTGTTTCATGCTGATCCTGATGATCTTGGG 378
*****

Manihot AAGGGGGACATGAACCTAGCAAAACCACTGGAAATGCTGGTGGCAGGATGATGTTGGT 438
Populus AAGGGAGGACATGAACCTAGCAAAAGCACTGGTAATGCTGGTGGCAGAGTATGATGTTGGT 438
Fagus AAGGGGGACATGAACCTAGCAAAAGCACTGGAAATGCTGGTGGCAGTATGCTGTTGGT 480
Eucalyptus AAGGGTGGGACGAACCTAGCAAAACCACTGGAAATGCTGGTGGCAGAGTGTGTTGGG 372
Arachis AAGGGTGGGATGAGCTTAGCAAAATCCACTGGAAATGCTGGTGGCAGAGTATGTTGGG 438
*****

Manihot GTTATTGGTTTGAAGGATAG 459
Populus GTTATTGGTTTGAAGGCTGA 459
Fagus ATCATTGGTCTCCAAGGATGA 501
Eucalyptus ATTATTGGCTGCAGGGA--- 390
Arachis ATTATTGGTTTGAAGGCTAG 459
*****

```

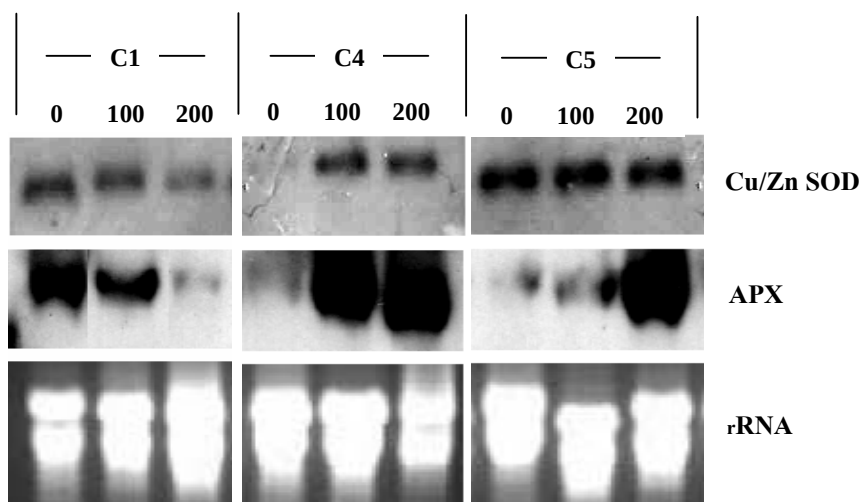
ภาพที่ 13 การวิเคราะห์ multiple alignments ระหว่างลำดับเบสของยีน Cu/Zn SOD ในยูคาลิปตัส กับลำดับเบสของยีน Cu/Zn SOD ในพืชชนิดอื่น

Fragaria	ATGGGGAAGTGCTACCCAACCGTGAGCGAGGAGTACAAGAAGGCCATCGACAAGGCCAAG	60
Eucalyptus	-----TGGGGTTTCATTCTGAGAAGAATTGCGCTCCGCTCATGCTCCGATTCGGG	51
Capsicum	ATGGGTAAGTGCTATCCCACTGTGAGCGCTGAGTACCTCAAGGCTGTTGACAAATGTAA	60
Nicotiana	ATGGGTAAGTGCTATCCCACTGTGAGCGAGGAGTACCTCAAGGCTGTTGACAAATGTAA	60
Camellia	ATGGGGAAGTGTTACCCAGCTGTGAGCGAGGAATACAAGAAGGCTATTGACAAAAGCCAAG	60
Fragaria	AGGAAGCTCAGAGGCTCATCGCGAAAAGAACTGCGCTCCTCTCATGCTCCGCTCTCGCA	120
Eucalyptus	-----TGGGGTTTCATTCTGAGAAGAATTGCGCTCCGCTCATGCTCCGATTCGGG	51
Capsicum	AGGAAACTCAGAGCACTAATGGCGAGAAGAATTGTGCTCCTATTATGCTCCGCTCTCGCC	120
Nicotiana	AGGAAACTCAGAGCACTAATGGCTGAGAAGAATTGCGCTCCTCTTATGCTCCGCTCTTGA	120
Camellia	AGGAAGCTCAGAGGCTCATAGCTGAGAAGAATTGTGCTCCGATTATGCTCCGCTCTCGCA	120
Fragaria	TGGCACTCTGCTGGAACCTATGATGTGAAAACCTAAGACCGGAGGCCATTGCGAAACCATG	180
Eucalyptus	TGGCACTCCGCGGTTACCTTCGATGTGAAGACGAAGACCGGAGGCCGTTCCGGAGCCATG	111
Capsicum	TGGCACTCTGCTGGTACCTATGATCTGTGCTCCAAAACCTGGAGGCTCCTTTTGGTACCATG	180
Nicotiana	TGGCACTCTGCTGGTACCTATGATCTGTGCTCCAAAACCTGGAGGCTCCTTTTGGTACCATG	180
Camellia	TGGCACTCTGCTGGTACTTACGATGTGACGACGAAGACCGGAGGCTCCGTTCCGGAACAATG	180
Fragaria	AAGCAGTCCGCTGAGCTCGCTCACGGGCTAACAATGGCTTGACATTGCTGTGACGGCTC	240
Eucalyptus	AAGCAGCTCCGCGAGCTAAGCTACGGGCTAACAAGCGGCTTCGACGTTTCCGCTCAGGCTC	171
Capsicum	AGGTTTCAAGCTGAGCAAGGCATGGTGCAAAACATGGTATTGACATTGCTATCAGACTC	240
Nicotiana	AGGCTCAAGGCTGAGCAAGGCATGGAGCAAAACATGGTATTGACATTGCTATCAGACTC	240
Camellia	AGGCACAAGCTTGAGCAAGGTCACGGGCGCAACAACGGCTTGAGATAGCGCTCAGGCTA	240
Fragaria	TTGGAGCCGATCAAGGAGCAGTTCCTATTCTCTCTTATGCTGACTTCTACCAAGTTGGCT	300
Eucalyptus	TTGCAAGCCGATCAAGGATCAGTTCCCATCATCACTTATGCTGATTCTTACCAAGCTGGCT	231
Capsicum	TTGGAGCCCATTAAGGAGCAGTTTCCACACTCTCCTATGCTGATTTCATCAATTAGCT	300
Nicotiana	TTGGAGCCCATTAAGGAGCAGTTTCCATCTCTCATATGGTATTCTATCAATTAGCT	300
Camellia	CTAGAGCCTATCAAGGAGCAGTTCCCGATCATCTCTTATGCTGACTTCTATCAGTTGGCT	300
Fragaria	GGAGTTGTTGCTGTTGAGGTACCGGTGGACCTGATGTTCCCTTCCACCCAGGAAGAGAG	360
Eucalyptus	GGCGTCTGTTGCTGTTGAGGTACTGGTGGACCTGAAGTTGCTTTTCAACCCGGAAGAGAG	291
Capsicum	GGTGTGTTGCTGTTGAGGTACTGGAGGACCTGATGTTCCCTTTCACCTCGCAGAGAG	360
Nicotiana	GGAGTTGTTGCTGTTGAGGTACTGGAGGACCTGATGTTCCCTTTCACCTCGTAGAGAG	360
Camellia	GGTGTGTTGCGCTGAAATTACTGGGGACCTGATGTTCCATTCCATCCAGGGAGGAG	360
Fragaria	GACAAGCCAGAACCCACCAGAGGCGCTCTTCTGATGCTGGAAGGGTTCTGACCAC	420
Eucalyptus	GACAAACCACAAACCACTCCCGAGGGCGCTCTTCTGATGCTACCAAGGGCTGTGACCAC	351
Capsicum	GACAAGCCAGAACCCACTGTTGAAGGTCGCTGCTGATGCCACCAAGGGCTCTGACCAC	420
Nicotiana	GACAAGCAGAGCCACCCGTTGAAGGTCGCTTGCCTGATGCTACCAAGGGCTGTGACCAC	420
Camellia	GATAAGCTGAGCCACTGTTGAAGGCGCTCTTCTGATGCTACCAAGGGAACGAGCAT	420
Fragaria	TTGAGGGAAGTGTGTTGGCAAAACCATGGGTCTCAGCAGCAGGACATTGTTGCTCTCTCT	480
Eucalyptus	TTGAGACAAGTGTGTTGTTGTTGAGGTGGGCTTCTGACAAGGATATTGTTGGCCCTCTCT	411
Capsicum	TTGAGGGACGTGTTTGTGAACAAATGGGTCTTCTGACAAGGATATTGTTGCACTCTCT	480
Nicotiana	TTGAGAGATGTGTTTGTGAAGCAAAATGGGTCTATCTGATAAGGATATTGTTGCACTCTCT	480
Camellia	CTGAGAGATGTGTTTGTGAACACATGGGCTCACTGACAAGGACATTGTTGCTCTATCT	480
Fragaria	GGTGGTCACACCTTGGGAAGGGCACACAAGGAACGGTCTGGATTGAGGGACCTGGACT	540
Eucalyptus	GGTGGCCATACCTTGGGAAGGTGCCACAAGGAGAGGTCTGGATTGAGGGAACTGGACC	471
Capsicum	GGTGGCCATACCTTGGGAAGGTGCCACAAGGAGCGTTCTGGTTTGGAGGACCTTGGACC	540
Nicotiana	GGTGGCCATACCTTGGGAAGGTGCCACAAGGAGCGTTCTGGTTTGGAGGACCTTGGACT	540
Camellia	GGTGGCCATACCTTGGGAAGGTGCCACAAGGAGCGTTCTGGATTGAGGGGCGCTGGACT	540
Fragaria	CCTAACCCCTCTTATCTTTGACAACCTCATATTTCACTGTGCTGTTGAGTGGAGAGAAGGAA	600
Eucalyptus	GCAAAATCCCTCATATTTCGACAACCTCGTACTTCAAGGAATTGTTGAGCGGAGAGAAGAAA	531
Capsicum	ACCAATCCCTCATATTGACAACCTCATACTTTAAGGAACCTCTGAGTGGGGAAAAAGAA	600
Nicotiana	ACCAATCCCTCATCTTTGACAACCTCATACTTTACGGAACCTTTGAGTGGGGAGAAAGAA	600
Camellia	GCCAATCCACTCATCTTTGATAACTCCTACTTCAAGGAACCTCTGACTGGGGAGAAAGAA	600
Fragaria	GGCCTTCTACAGCTTCCAACCTGACAAGGCTCTTCTGTCAGACCTGTCTTCCGCCCTCTT	660
Eucalyptus	GAACTTCTTACAGCTGCCAAGTGATAAGGCTCTTCTTCTGAGCCCTGTTTTCGCCCTCTT	591
Capsicum	GGGCTTTTACAGTTGCCATCAGACAAGGCTCTCCTCTCGGACCTGCTTTCGCCCTCTT	660
Nicotiana	GGGCTTTTGCAGTTGCCCTCAGACAAGGCTCTCCTCTCTGATCCTGCTTTCGCCCTCTT	660
Camellia	GGGCTTCTACAACCTGCCATCGCAAGGCTCTCCTCAATGATCCTGCTTTCGCCCTCTT	660
Fragaria	GTTGAGAAATACGCTGCGGATGAAGATGCTTTCTTTCTGATTATGCTCTAGCTCATCAG	720
Eucalyptus	GTTGAGAAATATGCTGCGGATGAAGATGCTTTCTTTGAAAGCTATGCTGAAGCCCATCTG	651
Capsicum	GTTGAGAAATATGCTGCGGATGAAGATGCTTTCTTTGCTGACTATGCTGAGGCTCACTTG	720
Nicotiana	GTTGAGAAATATGCTGCGGATGAAGATGCTTTCTTTGCTGACTATGCTGAGGCTCACTTG	720
Camellia	GTTGAGAAATATGCTGCGGATGAGGATGCATTCTTTGAGATTATGCCGAAGCCCATG	720
Fragaria	AGGCTCTCTGAGCTTGGTTTGTCTGAAGCTTAA	753
Eucalyptus	AAGCTCTCTGAACCTGGATTGCTGAAGCTTAA	684
Capsicum	AAGCTCTCTGAATTGGGATTCGCTGAAGCTTAA	753
Nicotiana	AAGCTCTCTGAATTGGGATTTGCTGAAGCTTAA	753
Camellia	AAGCTCTCTGAACCTGGGTTGCTGAGGCTGA	753

ภาพที่ 14 การวิเคราะห์ multiple alignments ระหว่างลำดับเบสของยีน APX ในยูคาลิปตัส กับ
ลำดับเบสของยีน APX ในพืชชนิดอื่น

2.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX ด้วยเทคนิค northern blot analysis (ภาพที่ 15) ในวันที่ 21 หลังจากย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX ในใบยูคาลิปตัส โคลน C4 และ C5 เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ control ในสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ ทำให้พืชเกิดสภาวะ oxidative stress ซึ่งจะชักนำให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species มากขึ้น ในพืชทนเค็มหลายชนิดมีการสังเคราะห์ antioxidant เพิ่มขึ้นเพื่อกำจัด reactive oxygen species ซึ่งมีรายงานในพืช *Setaria italica* สายพันธุ์ทนเค็ม พบว่าระดับการแสดงออกของยีนและกิจกรรมของเอนไซม์ Cu/Zn SOD และ APX ในไซโทซอลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเกิด electrolyte leakage ในพืช *Setaria italica* สายพันธุ์ทนเค็ม น้อยกว่าสายพันธุ์ไม่ทนเค็ม จากผลการทดลองนี้จึงสามารถตั้งสมมติฐานได้ว่า ยูคาลิปตัสโคลน C4 และ C5 มีกลไกที่ลดการเกิด oxidative stress ที่ถูกชักนำโดยสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ (Screenivasula *et al.*, 2000) แต่ในการศึกษาการเจริญเติบโต พบว่า โคลน C4 เป็นโคลนอ่อนแอ และโคลน C5 เป็นโคลนทนเค็ม แสดงให้เห็นว่ายูคาลิปตัสโคลน C5 อาจจะมีกระบวนการอื่นที่ช่วยในการปรับตัวต่อสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากความสามารถในการทนเค็มของพืชแต่ละชนิดมีกลไกที่แตกต่างกันและต้องอาศัยกลไกหลายอย่างร่วมกันด้วยจึงทำให้ โคลน C5 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าโคลน C1 และ C4

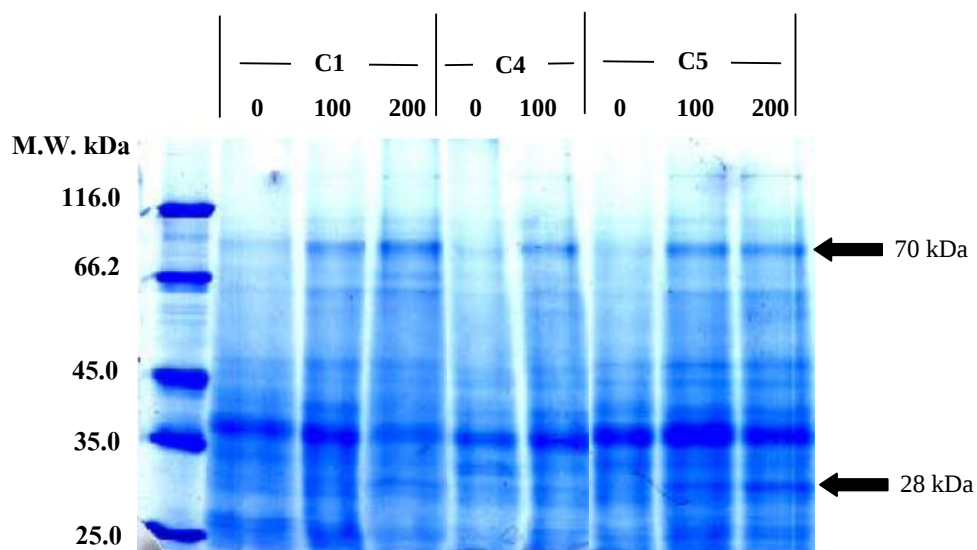


ภาพที่ 15 การแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX ของใบยูคาลิปตัส ทั้ง 3 โคลน (C1, C4 และ C5) หลังจากให้โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM เป็นเวลา 21 วัน หลังจากย้ายปลูก

2.3 ศึกษาโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นภายใต้สภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์

2.3.1 Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดในใบยูคาลิปตัส 3 โคลน (C1, C4 และ C5) ในวันที่ 21 หลังจากได้รับโซเดียมคลอไรด์ โดยการทำ SDS-PAGE ผลจากการศึกษาพบว่าโซเดียมคลอไรด์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดในใบยูคาลิปตัส โดยดูจากความเข้มของแถบแบนบน polyacrylamide gel (ภาพที่ 16) จากนั้นได้คัดเลือกโพลีเปปไทด์ 2 แถบ ที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์ ในยูคาลิปตัสโคลนทนเค็มได้แก่ โคลน C5 ซึ่งเป็นโคลนที่มีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดสูงที่สุด จากการคัดเลือกพบโพลีเปปไทด์ที่น้ำหนักประมาณ 28 และ 70 kDa เข้มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ภาพที่ 17) คาดว่าโพลีเปปไทด์ 2 ตำแหน่งนี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการบรรเทาสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ในยูคาลิปตัส ซึ่งคล้ายคลึงกับที่มีรายงานในข้าวโพด (Zorb *et al.*, 2004) และ ข้าว (Kong-ngern *et al.*, 2005)



ภาพที่ 16 รูปแบบของโปรตีน โดยการทำให้ SDS-PAGE ในใบยูคาลิปตัสทั้ง 3 โคลน (C1, C4 และ C5) ที่ได้รับไซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ เมื่อ 0 = 0 mM (control), 100 = 100 mM และ 200 = 200 mM และตำแหน่งโพลีเปปไทด์ ขนาดประมาณ 28 และ 70 kDa ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น เป็นเวลา 21 วัน หลังย้ายปลูก

2.3.2 วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโพลีเปปไทด์ขนาด 28 และ 70 kDa

เมื่อคัดเลือกแถบของโพลีเปปไทด์ 2 แถบ ที่มีการสังเคราะห์เพิ่มสูงขึ้นในยูคาลิปตัสโคลน C5 เมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์โดยมีน้ำหนักประมาณ 28 และ 70 kDa วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโพลีเปปไทด์ ทั้งสองตำแหน่งโดยใช้วิธี Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) พบว่าโพลีเปปไทด์ ขนาดประมาณ 28 kDa สามารถวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 10 fragments (ตารางที่ 5) ผลจากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโพลีเปปไทด์ ในฐานข้อมูลโปรตีน nrFASTA พบว่า เหมือนกับ ATP synthase CF1 beta subunit (ภาพที่ 17) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ ATP synthase complex มีลักษณะเป็นโปรตีนก้อนกลม ที่ยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ ATP ในคลอโรพลาสต์ (McCarty *et al.*, 2000) ATP มีความสำคัญมากในการสร้างพลังงาน เพื่อนำไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์สิ่งมีชีวิต (Ballmoos *et al.*, 2004) เช่น การสังเคราะห์พวก compatible solutes ได้แก่ proline และ glycine betaine ซึ่งล้วนแต่อาศัยพลังงานจาก ATP เพื่อให้พืชสามารถเจริญเติบโตและทนต่อสภาวะเครียดได้ นอกจากนี้การจับเก็บโซเดียมเข้าสู่แวคิวโอล เพื่อใช้ในการปรับออสโมติก และลดความเป็นพิษของโซเดียมในไซโทพลาสซึม ก็ยังต้องอาศัยพลังงานจาก ATP เช่นกัน ในการปรับตัวนี้พืชจะใช้ ATP ไปในกระบวนการ primary active transport ทำให้เกิด electrochemical gradient และ เกิด secondary active transport ช่วยในการขับเคลื่อนโซเดียมเข้าสู่แวคิวโอล ตามลำดับ (Kaim and Dimroth, 1998) จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า การสังเคราะห์ ATP synthase CF1 beta subunit ที่เพิ่มสูงขึ้นในยูคาลิปตัสโคลน C5 ซึ่งเป็นโคลนที่มีอัตราการรอดตายสูงสุด สามารถตั้งสมมติฐานได้ว่า การที่พืชทนเค็มได้ดีกว่า เนื่องจากพืชสามารถสร้าง ATP ได้สูงขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการต่าง ๆ เพื่อบรรเทาสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ในยูคาลิปตัส เช่นเดียวกับข้าวโพดที่มีการสังเคราะห์ ATP synthase CF1 beta subunit เพิ่มสูงขึ้นในใบและราก (Zorb *et al.*, 2004)

การศึกษานี้ยังพบโพลีเปปไทด์ขนาด 70 kDa ที่มีการสังเคราะห์เพิ่มสูงขึ้นในยูคาลิปตัสเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์ สามารถวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 7 fragments (ตารางที่ 6) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน nrFASTA พบว่า เหมือนกับส่วนของ heat shock protein 70 (HSP70) (ภาพที่ 18) ซึ่งพบมากในไซโทซอล และออร์แกเนลล์ต่าง ๆ heat shock protein (HSP) ถือเป็นกลุ่มของ stress protein ที่พบในทุกเซลล์ตลอดการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต หน้าที่ส่วนใหญ่ของ HSP70 เป็น molecular chaperones ซึ่งเกี่ยวข้องกับ กระบวนการ protein folding และ ป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนอื่น ๆ HSP บาง

ชนิดมีการสังเคราะห์เป็นปกติในเซลล์ แต่เมื่อเกิดภาวะเครียดในพืช จะส่งผลให้โปรตีนต่าง ๆ เกิดการรวมตัวเป็นกลุ่มก้อน (protein aggregation) และ เสียสภาพ (protein denaturation) ดังมีรายงานในฝ่าย พบว่ามีการสังเคราะห์ HSP70 เพิ่มขึ้นในสภาวะ osmotic stress ซึ่งเป็นสภาวะที่เซลล์ขาดน้ำ (Nepomuceno *et al.*, 2002) นอกจากนี้ Hamilton *et al.* (2001) ทำการทดลองในข้าว พบว่าสภาวะเครียดจากเกลือทำให้เกิดการสังเคราะห์ HSP70 เพิ่มขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้ จึงตั้งสมมติฐานต่อไปได้ว่า พืชจะสังเคราะห์ HSP70 เพิ่มขึ้นเมื่อเผชิญกับสภาวะเค็ม

ตารางที่ 5 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโพลีเปปไทด์ ขนาด 28 kDa จากไบยูกาลิปดัสโคลน C5 ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 100 mM

fragment	amino acid sequences
1	INPTSGPGVSTLEK (Ile-Asn-Pro-Thr-Thr-Ser-Gly-Pro-Gly-Val-Ser-Thr-Leu-Glu-Lys)
2	ISQIIGPVLDVAFPPGK (Ile-Ser-Gln-Ile-Ile-Gly-Pro-Val-Leu-Asp-Val-Ala-Phe-Pro-Pro-Gly-Lys)
3	AVAMSATDGLMR (Ala-Val-Ala-Met-Ser-Ala-Thr-Asp-Gly-Leu-Met-Arg)
4	IFNVLGEPVDDLGPVDTR (Ile-Phe-Asn-Val-Leu-Gly-Glu-Pro-Val-Asp-Asp-Leu-Gly-Pro-Val-Asp-Thr-Arg)
5	LSIFETGIK (Leu-Ser-Ile-Phe-Glu-Thr-Gly-Ile-Lys)
6	DVNEQDVLLFIDNIFR (Asp-Val-Asn-Glu-Gln-Asp-Val-Leu-Leu-Phe-Ile-Asp-Asn-Ile-Phe-Arg)
7	VVDLLAPYR (Val-Val-Asp-Leu-Leu-Ala-Pro-Tyr-Arg)
8	TVLIMELINNIK (Thr-Val-Leu-Ile-Met-Glu-Leu-Ile-Asn-Asn-Ile-Ala-Lys)
9	DVNVKQDVLLFIDNIFR (Asp-Val-Asn-Lys-Gln-Asp-Val-Leu-Leu-Phe-Ile-Asp-Asn-Ile-Phe-Arg)
10	FVQAQSEVSALLG (Phe-Val-Gln-Ala-Gln-Ser-Glu-Val-Ser-Ala-Leu-Leu-Gly)

ตารางที่ 6 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโพลีเปปไทด์ขนาด 70 kDa จากไบยูกาลิปดัสโคลน C5 ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 100 mM

fragment	amino acid sequences
1	VEIHANDQGNR (Val-Glu-Ile-Ile-Ala-Asn-Asp-Gln-Gly-Asn-Arg)
2	QFAAEEISS (Gln-Phe-Ala-Ala-Glu-Glu-Ile-Ser-Ser)
3	NAVVTVPAYFNDSQR (Asn-Ala-Val-Val-Thr-Val-Pro-Ala-Tyr-Phe-Asn-Asp-Gln-Arg)
4	IINEPTAAAIAYGLDK (Ile-Ile-Asn-Glu-Pro-Thr-Ala-Ala-Ala-Leu-Ala-Tyr-Gly-Leu-Asp-Lys)
5	ATAGDTHLGGEDFDNR (Ala-Thr-Ala-Gly-Asp-Thr-His-Leu-Gly-Gly-Glu-Asp-Phe-Asp-Asn-Arg)
6	FEELNMDLFR (Phe-Glu-Glu-Leu-Asn-Met-Asp-Leu-Phe-Arg)
7	NALENYAYNMR (Asn-Ala-Leu-Glu-Asn-Tyr-Ala-Tyr-Asn-Met-Arg)

1	MRINPTTSGP	GVSTLEKKNL	GRI SQII GPV	LDVAFPPG KM	PNIYNALVVK	GRDTIGQEIN
61	VTCEVQQLLG	NNRVR AVAMS	ATDGLMR GME	VIDTGAPLSV	PVGGATLGRI	FNVLGEPVDD
121	LGPVDTR TTS	PIHRSAPAFI	QLDTK LSIFE	TGIKVV DLA	PYR RGKGIGL	FGGAGVGK TV
181	LIMELIN NIA	KAHGGVSV FG	GVGERTREGN	GVGERTREGN	DLYMEMKESG	KVALVYGQMN
241	EPPGARMRVG	LTALTMAEYF	RDVNEQDV LL	FIDNIFRFVQ	AGSEVSALLG	RMPSAVGYQP
301	TLSTEMGTLQ	ERITSTKEGS	ITSIQAVYVP	ADDLTDPA	TTFAHLDATT	VLSRGLAAKG
361	IYPAVDPLDS	TSTM LQPRIV	GEEHYETAQR	VKQTLQRYKE	LQDIIAILGL	DELSEEDRLT
421	VARARKIERF	LSQPFFVAEV	FTGSPGKYVG	LAETIRGFKL	ILSGELDGLP	EQAFYLVGNI
481	DEATAKATNL	EMESKLKK				

ภาพที่ 17 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนขนาดประมาณ 28 kDa (ตัวอักษรสีแดง) ที่เหมือนกับ
ลำดับกรดอะมิโน ในฐานข้อมูล gi60460816: ATP synthase CF1 beta subunit

1	MAKSEGPAIG	IDLGTTYSCV	GVWQH DRVEI	IANDQGNR TT	PSYVGFTDTG	RLIGDAAKNQ
61	VAMNPTNTVF	DAKRLIGRRF	SSPAVQSSMK	LWPSRHLGLG	DKPMIVFNKY	GEEK QFAAEE
121	ISSMVL IKMK	EIAEAYLGST	IK NAVVT VPA	YFNDSQR QAT	KDAGVIAGLN	VMRIINEPTA
181	AAIAYGLD KK	ATSSGEKNVL	IFDLGGGTFD	VSLLTIEEGI	FEVK KATAGDT	HLGGEDFDNR
241	MVNHFVQEFK	RKNKKDISGN	PRALRRLRTA	CERAKRTLSS	TAQTIEIDS	LFEGIDFTPR
301	SSRAR FEELN	MDLFR KCMEP	VEKCLRDAKM	DKSSVHDVVL	VGGSTRIPKV	QQLQDFFNGK
361	ELCKSINPDE	AVAYGAAVQA	AILSSEGNER	SDLLLLDVTP	LSLGLETAGG	VMTVLIPRNT
421	TIPTKKEQVF	STYSDNQPGV	LIQVYEGERA	RTKDNLLGK	FELSGIPPAP	RGVPQITVTF
481	DIDVNNILNV	SAEDKTTGQK	NKITITNDKG	RLSKEEIEKM	VQAEKYKAE	DEEVKKKVDA
541	KNALENYAYN	MRNTIKDDKI	ASKLPAEDKK	KIEDAVDGAI	SWLDSNQLAE	VEEFEDKMKE
601	LEGICNPPIA	KMYXGEGAGM	GAAAGMDEDA	PSGGSGAGPK	IEEVD	

ภาพที่ 18 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนขนาดประมาณ 70 kDa (ตัวอักษรสีแดง) ที่เหมือนกับ
ลำดับ กรดอะมิโน ในฐานข้อมูล gi 224970: heat shock protein 70 (HSP70)

สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองเบื้องต้นได้คัดเลือกยูคาลิปตัสภายใต้สภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์จำนวน 3 โคลน โดยพิจารณาจากอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัส เนื่องจากมวลแห้งของยูคาลิปตัสในแต่ละโคลนไม่แตกต่างกัน ผลจากการคัดเลือก พบว่าโคลนที่มีอัตราการอยู่รอดสูงสุดสองลำดับแรก ได้แก่ โคลน C1 และ C5 กำหนดให้เป็นตัวแทนโคลนเดิม ส่วนโคลนที่มีการเจริญเติบโตต่ำสุดจำนวน 1 โคลน ได้แก่ โคลน C4 กำหนดให้เป็นตัวแทนโคลนอ่อนแอ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสทั้ง 3 โคลน ที่ได้รับการคัดเลือกพบว่าโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นทำให้การเจริญเติบโต (มวลแห้ง) และอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัสลดลง เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของพืชที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 200 mM พบว่า มวลแห้งของยูคาลิปตัสทั้ง 3 โคลน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่โคลน C5 มีอัตราการอยู่รอดสูงกว่าโคลน C1 และ C4 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) ดังนั้น โคลน C5 จึงเป็นโคลนทนเค็มมากที่สุด และเป็นโคลนที่คัดเลือกมาจากพื้นที่ดินเค็ม

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX ของยูคาลิปตัสทั้ง 3 โคลนในวันที่ 21 หลังจากย้ายปลูก พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX ในใบยูคาลิปตัส โคลน C4 และ C5 เพิ่มขึ้น แต่ในการศึกษาการเจริญเติบโต พบว่าโคลน C4 เป็นตัวแทนโคลนอ่อนแอ และโคลน C5 เป็นตัวแทนโคลนทนเค็ม แสดงให้เห็นว่ายูคาลิปตัสโคลน C5 อาจจะมีกระบวนการอื่นที่ช่วยในการปรับตัวต่อสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ จึงทำให้ทนเค็มกว่าโคลน C1 และ C4

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนพบว่า สภาวะเครียดที่เกิดจากโซเดียมคลอไรด์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนต่าง ๆ โดยมีแถบของโพลีเปปไทด์ 2 แถบเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่น้ำหนักประมาณ 28 และ 70 kDa เมื่อนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน nrFASTA พบว่าโพลีเปปไทด์ ขนาด 28 kDa ที่มีการสังเคราะห์เพิ่มสูงขึ้นในยูคาลิปตัสโคลน C5 เมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์เหมือนกับ ATP synthase CF1 beta subunit ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ ATP synthase complex เป็นตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ ATP ดังนั้น จึงสามารถตั้งสมมติฐานได้ว่าโคลน C5 อาจจะใช้ ATP ไปในกระบวนการปรับตัวต่าง ๆ จึงทำให้มีอัตราการรอดตายสูงสุด การศึกษานี้ยังพบโพลีเปปไทด์ขนาด 70 kDa ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าเหมือนกับ heat shock protein 70 (HSP70) ซึ่งมีการสังเคราะห์

เพิ่มขึ้นในยูคาลิปตัสทั้ง 3 โคลนเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์ดังนั้น HSP70 จึงเป็นเหมือนสัญญาณหนึ่งเมื่อพืชเผชิญกับสภาวะเค็ม

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX รวมทั้งการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในยูคาลิปตัส โคลนทนเค็มและโคลนอ่อนแอ ภายใต้สภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ทำให้ได้ข้อมูลเพื่อใช้เป็นความรู้ในการอธิบายกระบวนการทนเค็มของยูคาลิปตัส และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาพันธุ์ทนเค็ม และ พัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้เป็นตัวชี้วัดสำหรับการคัดเลือกยูคาลิปตัสที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตบนพื้นที่ดินเค็มสำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต